

# 行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

## 子計畫六：生物可分解塑膠 PHA/Chitosan 複合薄膜之合成 與生醫應用(II)

計畫類別：整合型計畫

計畫編號：NSC94-2621-Z-032-003-

執行期間：94 年 08 月 01 日至 95 年 07 月 31 日

執行單位：淡江大學化學工程與材料工程學系

計畫主持人：鄭廖平

報告類型：完整報告

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 95 年 10 月 30 日

## 綠色材料—生物可分解聚酯材料量產技術、功能化及分解技術開發-子計畫 六：生物可分解塑膠 PHA/Chitosan 複合薄膜之合成與生醫應用(II)

執行單位：淡江大學化學工程與材料工程學系      計畫編號：NSC 94-2621-Z-032-003-

總計畫主持人：董崇民

計畫主持人：鄭廖平

研究人員：洪漢祥

連絡方式：[lpcheng@mail.tku.edu.tw](mailto:lpcheng@mail.tku.edu.tw)

### 中文摘要

本研究延續 93 年度計畫，開發幾丁聚醣/PHB複合薄膜，並探討其在生醫方面的應用。複合薄膜之製作乃合併電漿誘導聚合與固定化兩種技術：首先將PHB薄膜表面電漿接枝聚丙烯酸，然後以EDAC為反應活化劑將幾丁聚醣固定於薄膜表面。分別將不同孔隙結構及幾丁聚醣固定量之薄膜，用於骨母細胞之培養與革蘭氏陰性菌*Escherichia coli*. 及陽性菌*Bacillus cereus*之抗菌測試，結果顯示隨幾丁聚醣固定量增加，細胞生長活性提高，而抗菌性也增強，其中以多孔型PHB薄膜表面固定  $0.26 \mu\text{mole}/\text{cm}^2$  幾丁聚醣時MTT吸收值及細胞貼附數量有最明顯的提升，並對*E. coli*及*B. cereus*均可達到近 80%的抗菌活性。

關鍵字：生物可分解高分子，聚丁基烷酯，多孔型薄膜，表面改質，幾丁聚醣

### Abstract

In this research, the techniques established in previous projects were used to prepare chitosan/PHB composite membranes. These membranes were then applied in the biomedical field. The techniques of plasma induced polymerization and immobilization were employed to prepare the composite membranes. First, poly(acrylic acid) was grafted on PHB membrane by plasma induced polymerization, then chitosan was immobilized by reacting with PAA using 1-ethyl-3-(3-diethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride (EDAC) as an activation agent. Membranes with different porous structures and/or immobilize chitosan yields were used in culture of osteoblast cells and antibacterial tests of gram-negative (*Escherichia coli*), gram-positive (*Bacillus cereus*) bacteria. The biocompatibility and antibacterial activities were found to increase with increasing amount of chitosan on the membrane, for which porous membrane immobilized with  $0.26 \mu\text{mole}/\text{cm}^2$  chitosan improved most in terms of cell MTT absorption and quantity of attachment. Also, an antibacterial activity of ~80% for both *E. coli* and *B. cereus* was achieved by this membrane.

Keywords: biodegradable polymer, poly(3-hydroxybutyrate), porous membrane, surface modification, chitosan.

## 一、前言

生物可分解性高分子<sup>[1~5]</sup>在生醫應用方面有相當好的潛力，主要是取其可被人體自然分解，所生成的副產物對人體無害或可被自然代謝，如此一方面可以避免患者再次接受手術的困擾與風險，二來也避免代謝產物沉積於人體內形成副作用，因此對於只需短時間使用的非永久性生醫材料，生物可分解性高分子是一個良好的選擇。以微生物發酵製造的聚羥基丁酯類(Poly(3-hydroxybutyrate); PHB)是一種重要的生物可分解性塑膠，它具有高熔點、高結晶性、易熱分解及良好的生物相容性等特點，然而與泛用塑膠或澱粉類生物分解型高分子比較，其價格卻高出許多，因此基於實用角度考量，必需發展高附加價值之產品，才能符合經濟與環保之效益。

身體之骨組織常因外在因素(如重傷)或病變(如腫瘤移除、骨髓炎)而產生骨缺陷(bone defect)，除非骨骼再生恢復原功能，否則短時間內無法癒合，其治療方式常利用骨移植手術來填補缺陷，但此方法卻因自體和異體的骨頭供應來源而有所限制，故近年來發展出利用高分子作為誘導組織重建(guided tissue regeneration)的材料<sup>[6~10]</sup>，所謂誘導組織重建即是在骨缺陷處以高分子薄膜將傷口覆蓋，一方面隔離纖維細胞或結締組織在傷口上生長，另一方面作為使骨組織癒合重建之鷹架。

在高分子薄膜表面塗佈促進細胞生長的物質，是製作組織重建薄膜最簡單的作法，事實上也確實具有效果，但塗佈的物質會隨植入的時間增長而流失掉，無法長期附著，因此許多研究都朝向表面固定化，以得到更穩定的材料<sup>[11~14]</sup>。本研究以多孔型PHB薄膜作為電漿接枝聚丙烯酸之基材，聚丙烯酸則可作為固定幾丁聚醣(Chitosan; CS)的橋樑<sup>[15]</sup>。PHB薄膜電漿接枝聚丙烯酸之反應機制示於Figure 1，首先將薄膜照射電漿生成自由基，接著將薄膜曝於空氣中，產生過氧化基(Figure 1 (A))，然後將此薄膜與丙烯酸接觸引發聚合反應，此反應可分為兩種機制<sup>[16~18]</sup>，其中Figure 1 (B)所示為加熱分解法；Figure 1 (C)所示為氧化還原分解反應，本研究同時採用上述兩種接枝機制，即在丙烯酸溶液中加入適量亞鐵離子並同時加熱，來進行接枝聚合反應。

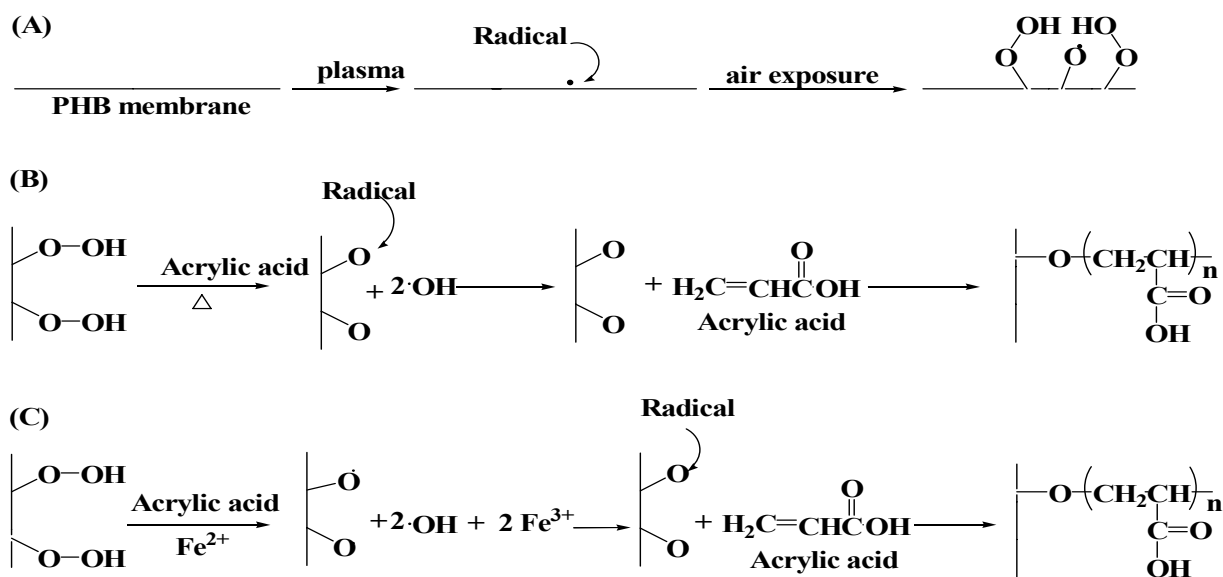


Figure 1 電漿誘導接枝聚合反應示意圖。

聚丙烯酸可與幾丁聚醣反應而將其固定於薄膜上，我們選擇 1-ethyl-3-(3-diethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride (EDAC) 作為反應活化劑，其作用原理示於Figure 2<sup>[19~23]</sup>，首先將薄膜表面上聚丙烯酸之羧酸基予以活化，即與EDAC反應生成O-acrylisourea，然後再與幾丁聚醣之胺基反應形成醯胺鍵結，使其固定於PHB薄膜表面。

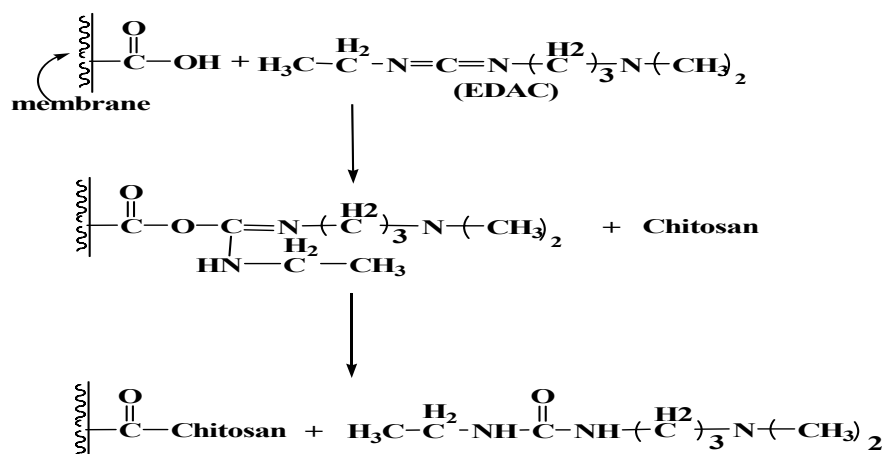


Figure 2 薄膜表面上之聚丙烯酸與幾丁聚醣反應。

## 二、實驗方法

### 1. 實驗材料

#### (1) 薄膜製備

聚羥基丁酯(Poly(3-hydroxybutyrate); PHB): Aldrich。氯仿(Chloroform): Acros, 99.8%。乙醇(Ethanol): Fluka, 99.8%。正己烷(Hexane): 六合化學, 95%工業級。

#### (2) PHB 薄膜電漿接枝聚丙烯酸

丙烯酸(Acrylic acid): Acros, 99.5%。氫氧化鈉(Sodium hydroxide): Acros。鹽酸水溶液(Hydrochloric acid solution, 1N): Acros。硫酸亞鐵(Ammonium Iron(II) sulfate hexahydrate, Mohr's salt): Junsei Chemical。

#### (3) 共價鍵結固定幾丁聚醣

幾丁聚醣((1-4)-2-amino-2-deoxy-β-D-glucan; Chitosan): 東京化成工業 (TCI)。活化劑(1-ethyl-3-(3-diethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride, EDAC): Acros。緩衝液: 磷酸緩衝溶液(Phosphate buffer solution, PBS)

#### (4) 培養骨母細胞

骨母細胞(hFOB 1.19): human osteoblast cell line。乳糜胰蛋白酶(Trypsin type III): Sigma, M = 23000 g/mole。EDTA(Ethylene diaminetetra-acetic acid): Sigma, 99.99%。胎牛血清(FBS), Gibco BRL。MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenylterazolium bromide), Sigma。戊二醛(Glutaraldehyde): Sigma, 25% by weight in water。

#### (5) 抗菌測試

固體培養基: Nutrient Agar (NA), DIFCO。液體培養基: Nutrient Broth (NB), DIFCO。

仙人掌桿菌：*Bacillus cereus* TKU006，淡江大學生命科學所。大腸桿菌：*Escherichia coli*，淡江大學生命科學所。

## 2. 實驗

### (1) 薄膜製備

#### (A) 浸漬沈澱法製備 PHB 薄膜

將 PHB 加入氯仿中，加溫攪拌使其溶解，靜置於室溫下 2 個小時，以除去製膜液中之氣泡；將適量製膜液以刮刀塗佈於載體上，然後將其浸入沉澱槽中，待成膜後，將薄膜取出浸入正己烷中 24 小時，利用正己烷將殘留在薄膜孔洞中之乙醇置換出來，並利用正己烷之高揮發性，防止薄膜孔隙結構在乾燥過程中塌陷下來，浸泡完畢後，將薄膜取出乾燥之。

#### (B) 乾式法製備 PHB 薄膜

如前所述配置適當濃度之製膜液，以刮刀塗佈於載體上，然後置於室溫中一段時間(約十分鐘)，待薄膜形成後，將其置於烘箱中升溫至 50 °C 並抽真空以除去殘餘溶劑，測試其性質。

### (2) PHB 薄膜電漿接枝聚丙烯酸

首先以減壓蒸餾法將丙烯酸中微量之聚合抑止劑(MEHQ)去除，再將純化後之丙烯酸配製成所需濃度之水溶液並除氧待用。將 PHB 薄膜放入電漿反應器中，將反應室抽真空至  $2 \times 10^{-2}$  torr 除氧二十分鐘，通入氬氣使壓力保持在 0.4 torr，打開電漿使薄膜的表面產生自由基，然後將其曝於空氣中使自由基轉換為過氧化基，將薄膜放入配製好的丙烯酸溶液中，升溫至 50 °C 反應，待反應完成後取出，以蒸餾水反覆清洗，烘乾備用。將未改質薄膜於 50 °C 乾燥，並用天平秤重紀錄其重量( $w_0$ )，再將表面改質處理後之薄膜清洗烘乾後秤其重量( $w_1$ )。接枝密度 = (改質後  $w_1$  - 改質前  $w_0$ ) / 薄膜面積。

### (3) 共價鍵結固定幾丁聚醣

將已接枝聚丙烯酸的薄膜放入活化劑中(EDAC 溶於 PBS 緩衝溶液)，將丙烯酸上的羧基進行活化，pH 調整在酸性範圍，溫度為 4 °C，待反應完成後，將薄膜取出，並置於含幾丁聚醣的 1% 醋酸溶液中進行反應，溫度為 4 °C，反應完成後以 1% 醋酸水溶液反覆清洗薄膜 4 次(搖盪機 100 rpm、25 °C、2 小時/次)，以去除未反應的幾丁聚醣，再將薄膜以蒸餾水清洗(去除醋酸水溶液)，並將薄膜於 50 °C 乾燥，之後置入乾燥箱中保存。

### (4) 培養骨母細胞

#### (A) 初代之骨母細胞培養

實驗所使用的骨母細胞為人類骨母細胞株(hFOB 1.19)。細胞培養基乃為市售的 DMEM/F12 培養液(外加入 2 mM L-glutamine, 10 mM HEPES, 100 U/ml penicillin, 100 mg/ml streptomycin)，混和 10% 胎牛血清 FBS (Fetal Bovine Serum) 調配而成，細胞株及培養基混和均勻後放入細胞培養箱 (37 °C、5% CO<sub>2</sub>) 中進行培養。

#### (B) 薄膜前處理

將薄膜裁剪成 1.5 cm<sup>2</sup> 的大小，置於 24 孔培養盤中，並用 Teflon 環將薄膜固定，加入 70% 酒精浸泡一天，並同時以 UV 燈照射，以達到徹底滅菌的效果，再以 PBS 緩衝溶液反覆沖洗，將酒精除去。

### (C) 薄膜的細胞培養

自細胞培養箱中取出已培養完成的骨母細胞培養盤，倒掉培養液，以 PBS 緩衝溶液反覆沖洗，以確保培養液完全去除，將胰蛋白酶溶液(0.25 % Trypsin)加入培養盤中，使其覆蓋整個培養盤，將細胞由培養盤中打下，然後加入培養液稀釋，以降低胰蛋白酶溶液對細胞的傷害，之後置於離心管中離心(1500 rpm，20 °C，5min)，離心完成後去除上層澄清液，保留管底白色細胞，然後加入適量培養液，並進行細胞計數。

細胞計數所使用的計數盤為血球計數器(Hemocytometer)。計數時，先將培養液與骨母細胞混和均勻，以微量分注器自離心管中吸取 100µl 細胞浮懸液，注入試樣管中，同時吸取染色劑 trypan blue 100 µl 將兩者混和，並以微量分注器吸抽多次使之均勻混和，而後將適量細胞浮懸液滴於計數盤與蓋玻片的空隙中進行細胞計數。由於 trypan blue 會將死細胞染成藍色，而活細胞則無法染上顏色，故於計算細胞時可於顯微鏡下，算出計數盤四個角的活細胞數目和(N)，而總細胞數目可由此式求得：

$$\text{細胞數}(\text{cell/ml}) = (N/4) \times (\text{稀釋倍數}) \times 10^4$$

將細胞種入含有薄膜試片的 24 孔細胞培養盤中，細胞數目控制為  $6 \times 10^4$  cells/ml，每孔的細胞培養液含量為 1 ml，每試片均作 4 重覆，將培養盤放進培養箱中分別培養 1、2、3、4 天後取出，移除培養液，先以 PBS 清洗，再用下列方式進行評估細胞的生長與貼附情形。

### (D) 評估骨母細胞生長情形

#### (i) 細胞活性試驗(MTT test)

經過培養之骨母細胞乃是以 MTT 試驗來測定其活性。將培養盤中的培養液抽出，以 PBS 溶液沖洗，在每個孔中加入 500µl 培養液及 75 µl 濃度為 5 mg MTT/ml PBS 之試劑，在 37 °C 下培養 3 小時，加入 500µl 異丙醇來溶解藍色結晶，並放置在搖盪器上 15 分鐘使其均勻，從細胞浮懸液中吸取 200 µl 注入培養盤中，作 3 重複，用 ELISA 在波長 570 nm 處讀取吸收值。

#### (ii) 掃描式電子顯微鏡觀察

從培養箱裡將培養盤拿出，去除培養液，用 PBS 清洗後，以戊二醛固定細胞，並進行臨界點乾燥以防細胞變形，將樣品表面鍍金處理後，以掃描式電子顯微鏡觀察細胞形態；臨界點乾燥之前須先經過固定步驟，目的在於將細胞內的水分以酒精置換而保存細胞的形態。固定步驟如下：

1. Glutaraldehyde/PBS (2.5 %) 1hr
2. PBS Washing 15min × 2
3. 60%乙醇 10 min
4. 70%乙醇 10 min
5. 80%乙醇 10 min
6. 90%乙醇 10 min
7. 100%乙醇 10 min

### (5) 抑菌性測試

#### (A) 培養基的配製

將 Nutrient Broth (NB)及 Nutrient Agar (NA)依比例分別溶於蒸餾水中，待溶解完全後於 121°C 滅菌 30 分鐘。回溫後，將 NB 保存於 4 °C 以供使用；將 NA 於 40 °C 時，取適量倒入培養皿中，冷卻至室溫，待其完全凝固後，以封口膜密封並保存於 4 °C。

### (B) 受試菌株及保存

將菌株(*Escherichia coli* 與 *Bacillus cereus*)，於無菌狀態下自保存管中取出，將先前配製好的 NB 倒入無菌試管後，迅速勾取一白金耳菌株粉末至其中，於 37 °C 下培養(活化)18~24 小時；待菌株活化後，再勾取一白金耳之菌液，以 S 形劃在保存好的 NA 上，在相同活化條件下，將培養皿倒放，再活化一代，保存於 4 °C 以供抗菌測試時使用。

### (C) 抑菌圈測試

將 NA 依比例分別溶於蒸餾水中，待溶解完全後於 121°C 滅菌 30 分鐘。回溫後，將 NA 於 40 °C 時，取適量倒入培養皿中，待 NA 完全凝固分佈於培養皿中，加入 0.1 ml 菌液於 NA 表面，並使用 L 型玻璃棒均勻塗佈菌液於培養皿中，接著將改質與未改質薄膜輕輕放於 NA 表面並使其密接，並於 37 °C 下培養 24 小時後觀察抑菌效果。

### (D) 菌液吸光度測試

本計劃引用 ASTM E2149-01 之檢測方式，將上述(B)已活化二代在固體培養基上之菌株，自 4 °C 回溫至室溫後，勾取一白金耳菌株後迅速放入無菌之液體培養基試管中，於 37 °C 下活化 6 小時，即成為抗菌測試時所需添加之菌液(第三代)。將固定面積並完成滅菌之待測薄膜樣品置於無菌試管中，添加無菌之 NB(5ml)及預先已活化至第三代之菌液(0.1 ml)，以震盪器充分混合，於 37 °C 震盪下恆溫震盪(200rpm)培養 24 小時；另外，增加兩組無樣品之對照組，一組為添加菌液後立即量測其菌數( $A_0$ )，第二組為添加菌液後培養 24 小時後量其菌數(A)，並作三重複使實驗更加準確。

試管於活化 24 小時後，使用紫外光/可見光分光光度計測菌液之吸光值(660nm)，利用其混濁度( $OD_{660}$ )之差異性，計算出不同樣品之相對抑制細菌活性效果。

$$\text{抑菌百分率(\%)} = \left[ 1 - \frac{(B - A_0)}{(A - A_0)} \right] \times 100$$

$A_0$  = 未添加樣品震盪前的菌數(CFU/ml)

A = 未添加樣品震盪 24 小時後的菌數(CFU/ml)

B = 樣品震盪 24 小時後的菌數(CFU/ml)

## 三、結果與討論

### 3.1 薄膜之結構與接枝聚丙烯酸

於 91 年度研究中我們製備不同孔隙結構之 PHB 薄膜(製膜系統包含乙醇—氯仿—PHB 等三成份；其中乙醇與氯仿分別為非溶劑與溶劑)，於 92、93 年度中將其表面進行改質，接枝聚丙烯酸(PAA)賦予其功能性，並以 PAA 為橋樑使幾丁聚醣固定於薄膜表面上。Figure 3 顯示所研製之 PHB 薄膜，Figure 3 (a) 為代號 Film 的薄膜上表面，可發現其結構相當緻密緊實，而 Figure 3 (b) 為代號 M<sub>80</sub> 的薄膜表面，其為多孔結構，由於其孔隙度

差異頗大，適合用為研究孔隙結構對細胞培養之影響。

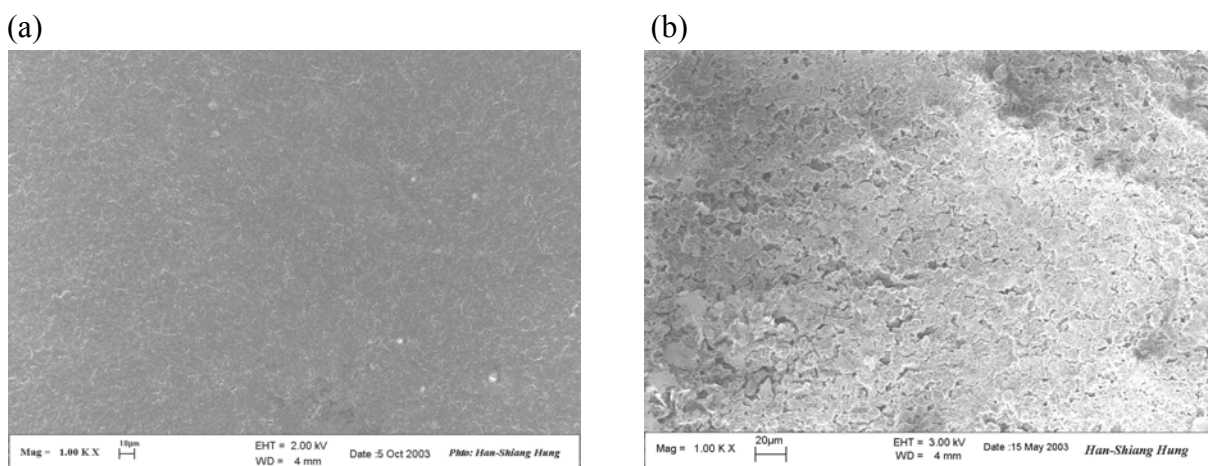


Figure 3 SEM photomicrographs showing the morphologies of the top surfaces of PHB membranes. (a) Film; (b) M<sub>80</sub>.

上述兩種薄膜接枝聚丙烯酸之主要結果示於 Table 1 (詳細接枝量及條件，請參閱 92 年成果報告)，可發現多孔薄膜之接枝量皆大於緻密薄膜，這主要是因為多孔薄膜具備較大的表面積所致。接著將幾丁聚醣固定在已接枝 PAA 之薄膜上，其結果示於 Table 2(詳見 93 年成果報告)，可發現同一結構之薄膜(緻密型或多孔型)，其表面接枝的聚丙烯酸量越高時，所固定的幾丁聚醣量也越高，多孔型薄膜之固定量則高於緻密型薄膜達數倍之多。

Table 1 Grafting yields of poly(acrylic acid) on “Film” and “M<sub>80</sub>”.

Code	Substrate	PAA Grafting yield (mg/cm <sup>2</sup> )	Grafted amount of -COOH (µmole/cm <sup>2</sup> )
low-PAA/PHB(Film)	Film	0.07	1
high-PAA/PHB(Film)	Film	0.16	2.22
low-PAA/PHB(M80)	M <sub>80</sub>	0.12	1.67
high-PAA/PHB(M80)	M <sub>80</sub>	0.48	6.67

Table 2 Immobilization yields of chitosan on poly(acrylic acid) / PHB membranes.

Code	Substrate	Surface density of amino group (µmole/cm <sup>2</sup> )
CS/low-PAA/PHB(Film)	low-PAA/PHB(Film)	0.026
CS/high-PAA/PHB(Film)	high-PAA/PHB(Film)	0.037
CS/low-PAA/PHB(M80)	low-PAA/PHB(M80)	0.11
CS/high-PAA/PHB(M80)	high-PAA/PHB(M80)	0.26

Reaction condition: EDAC activation at pH 3 for 6hr, EDAC concentration = 0.05 M, immobilization time = 12 hr, chitosan concentration = 10 mg/ml.



### 3.2 薄膜對細胞生長之影響

本研究中分別將接枝聚丙烯酸與固定幾丁聚醣後之薄膜進行細胞培養，探討不同化學組成對細胞成長的影響。由Figures 4 與 5 中之MTT吸收值可發現不論Film或M80 接枝聚丙烯酸後皆不利於骨母細胞生長，此乃因聚丙烯酸之羧基造成薄膜表面呈負電荷狀態所致<sup>[24]</sup>，且聚丙烯酸接枝量越多其影響越明顯。薄膜表面固定幾丁聚醣後，培養 1~3 天時MTT吸收值有上升之趨勢，第 3 天時為最大吸收值，可發現所固定的幾丁聚醣量越多改善越明顯，這是由於幾丁聚醣與聚丙烯酸形醯胺鍵結反應，降低了表面羧基數目，同時也增加材料表面正電荷，改善了負電荷不利於細胞生長的狀態，研究中以CS/high-PAA/PHB(M80)改善程度最為明顯，與純幾丁聚醣緻密膜相當，但吸收值仍未高於控制組TCPS。

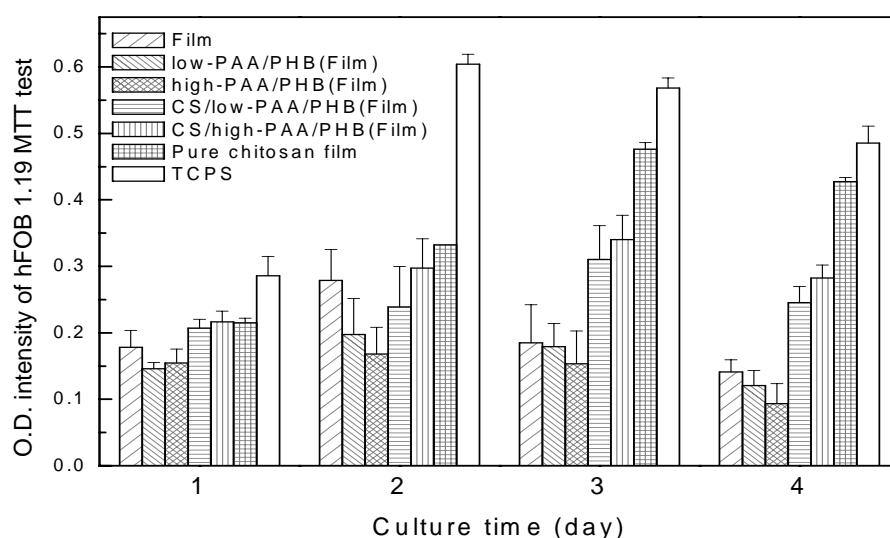


Figure 4 MTT tests of hFOB 1.1.9 cells grown and proliferated on modified and unmodified PHB films.

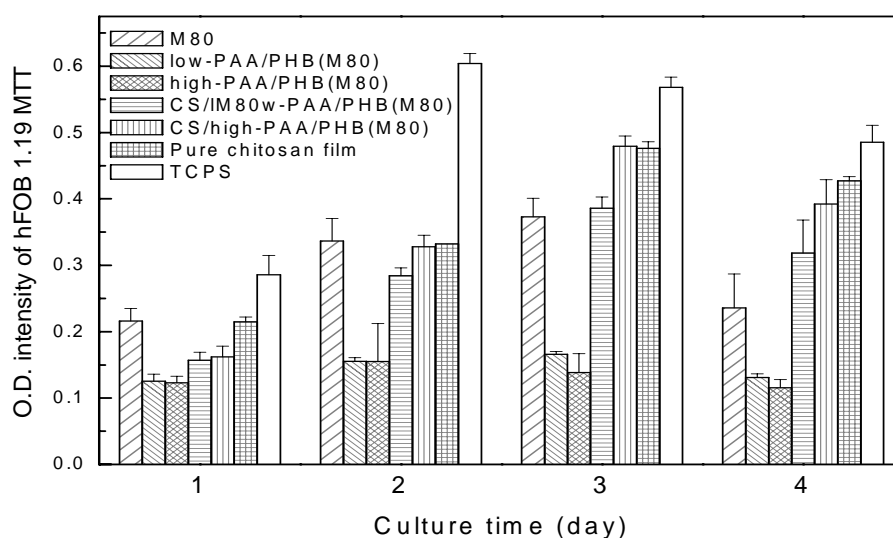


Figure 5 MTT tests of hFOB 1.1.9 cells grown and proliferated on modified and unmodified M80 films.

unmodified membrane M<sub>80</sub>.

先前研究顯示骨母細胞在接枝聚丙烯酸薄膜上培養時，其貼附量低且型態呈萎縮現象，亦即骨母細胞並不適合在具有羧酸基的環境下成長。骨母細胞培養在固定幾丁聚醣之薄膜一天與三天後之型態示於 Figures 6、7，培養第一天時細胞在各薄膜間的差異並不大，培養至第三天時可發現細胞長大而貼附的現象，其中以 M80 固定大量幾丁聚醣的提升程度最為明顯，可見幾丁聚醣具有提升細胞活性之能力。

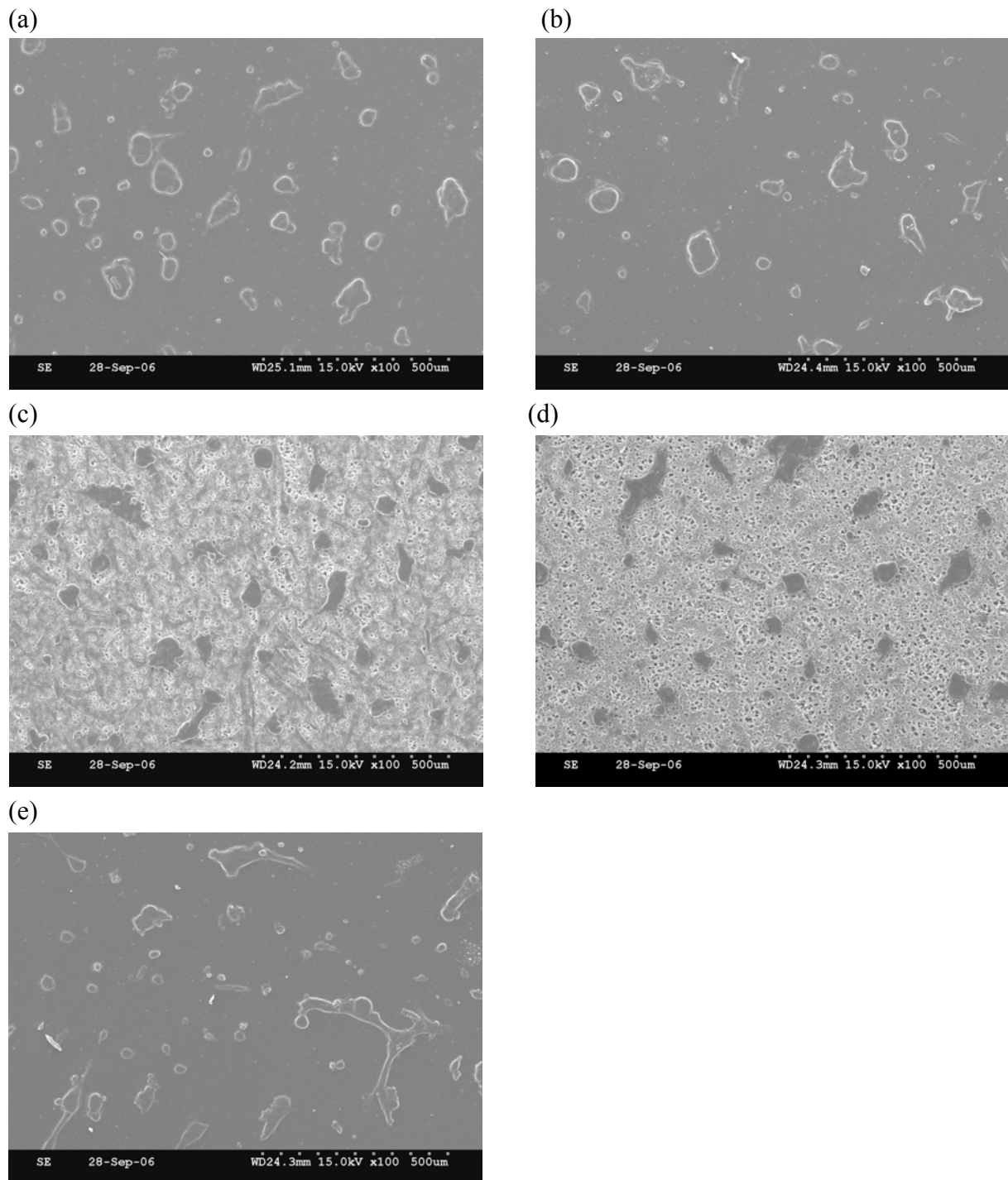


Figure 6 SEM photomicrographs of the morphologies of hFOB 1.19 cells cultured on various membranes for 1 day. (a) CS/high-PAA/PHB(Film); (b) CS/low-PAA/PHB(Film); (c)

CS/high-PAA/PHB(M80); (d) CS/low-PAA/PHB(M80); (e) chitosan.

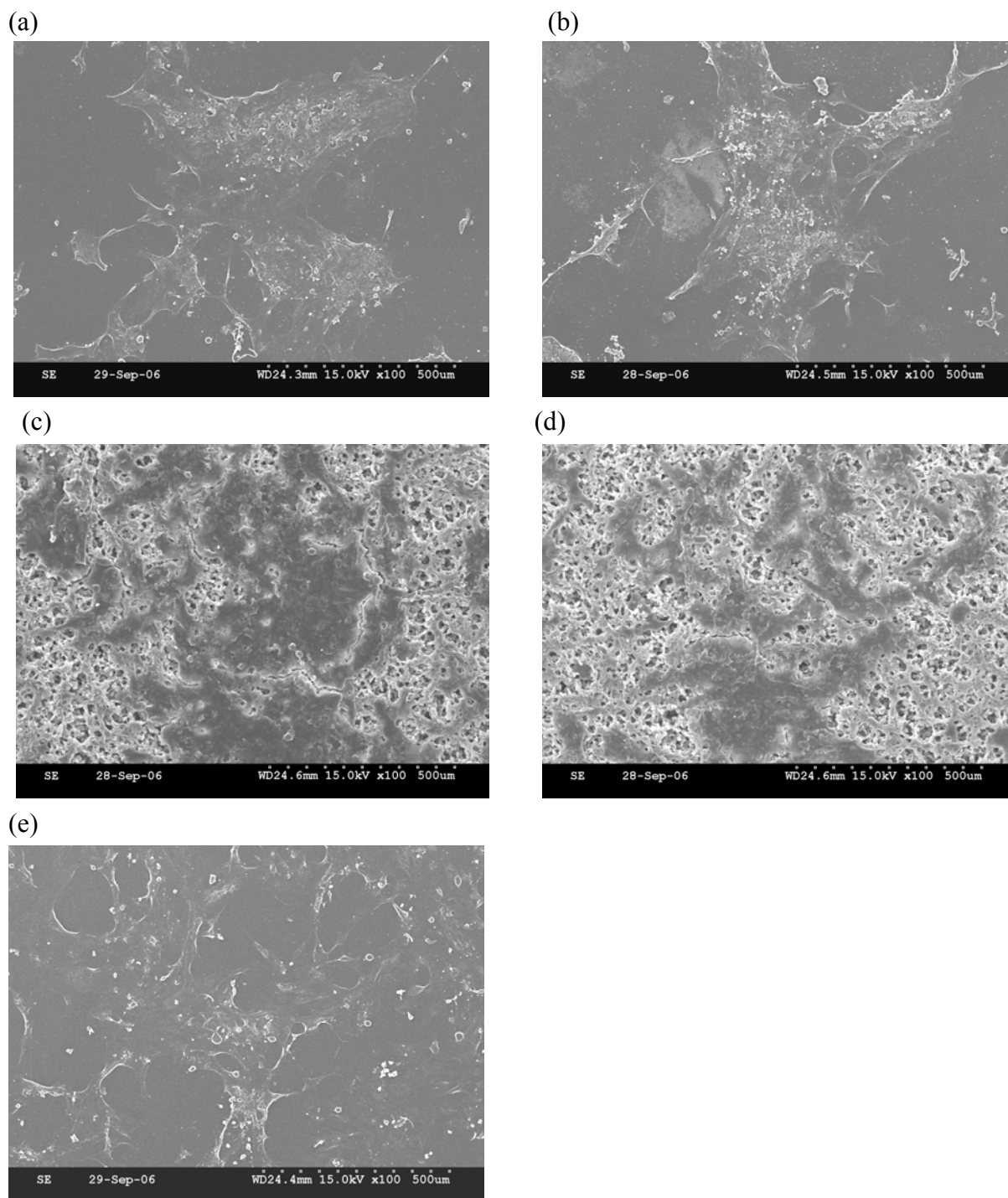


Figure 7 SEM photomicrographs of the morphologies of hFOB 1.19 cells cultured on various membranes for 3 days. (a) CS/high-PAA/PHB(Film); (b) CS/low-PAA/PHB(Film); (c) CS/high-PAA/PHB(M80); (d) CS/low-PAA/PHB(M80); (e) chitosan.

### 3.3 抑菌性測試

Figure 8與9為各式薄膜分別與大腸桿菌及仙人掌桿菌培養24小時後之抑菌活性，可發現PHB薄膜的表面為緻密(Film)或多孔(M80)結構並不影響其抑菌活性，但薄膜表面接

枝聚丙烯酸後，其抑菌活性則有明顯的提升，並隨聚丙烯酸接枝量的增加而提升其抑菌活性，尤其對於仙人掌桿菌抑菌活性提升最為明顯。PHB薄膜表面經固定幾丁聚醣後，對於兩種細菌之抑菌活性皆可提升至接近80%，與純幾丁聚醣之抑菌活性相去不遠。

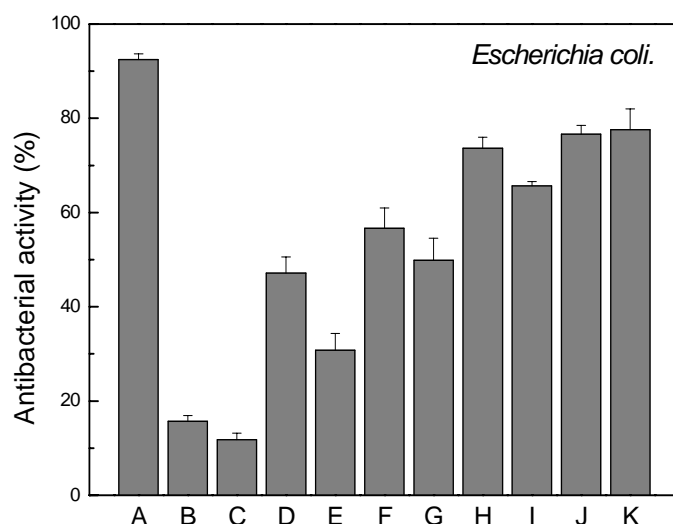


Figure 8 Antibacterial activities of various membranes against *Escherichia coli*. (A) chitosan; (B) Film; (C) M80; (D) high-PAA/PHB(Film); (E) low-PAA/PHB(Film); (F) high-PAA/PHB(M80); (G) low-PAA/PHB(M80); (H) CS/high-PAA/PHB(Film); (I) CS/low-PAA/PHB(Film); (J) CS/high-PAA/PHB(M80); (K) CS/low-PAA/PHB(M80).

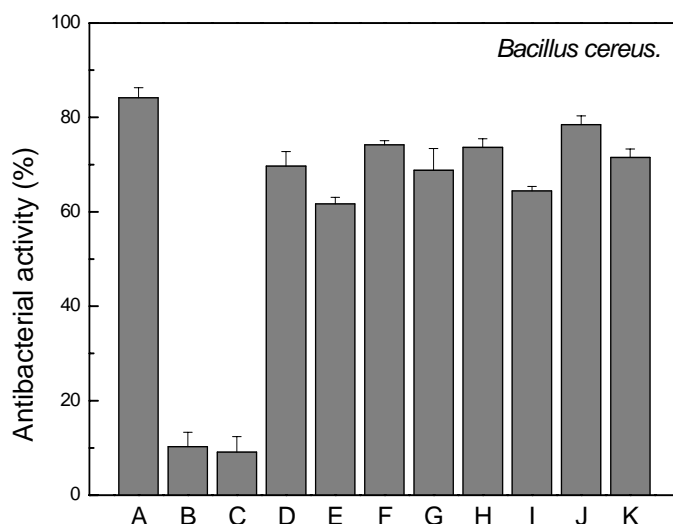


Figure 9 Antibacterial activities of various membranes against *Bacillus cereus*. (A) chitosan; (B) Film; (C) M80; (D) high-PAA/PHB(Film); (E) low-PAA/PHB(Film); (F) high-PAA/PHB(M80); (G) low-PAA/PHB(M80); (H) CS/high-PAA/PHB(Film); (I) CS/low-PAA/PHB(Film); (J) CS/high-PAA/PHB(M80); (K) CS/low-PAA/PHB(M80).

#### 四、結論

1. 本研究利用骨母細胞(hFOB 1.19)進行各種改質與未改質PHB薄膜之生物相容性測試，發現多孔型薄膜比緻密型薄膜有較佳相容性；薄膜表面經由聚丙烯酸改質會造成細胞不易存活之現象，但薄膜經固定幾丁聚醣後，隨固定量增加而提升其MTT 吸收值，尤其以多孔型PHB薄膜固定  $0.26\mu\text{mole}/\text{cm}^2$  幾丁聚醣時有最佳的效果。
2. 本研究利用革蘭氏陰性菌-大腸桿菌及陽性菌-仙人掌桿菌進行抗菌測試，發現改變薄膜孔隙結構對抑菌活性並沒有影響；薄膜表面接枝聚丙烯酸後有提升抑菌活性之現象，尤其對仙人掌桿菌的抗菌活性提升最為明顯；經固定幾丁聚醣後對兩種細菌更達到近 80%的抑菌活性。

#### 五、參考文獻

1. K. Studesh, H. Abe and Y. Doi, *prog. Polymer. Sci.*, **25**, (2000).
2. M. Jenzsch, N. Volk, J. Kressler and C. Scholz, *Biomacromolecules*, **2**, 1055 (2001).
3. J. N. Hay and L. Sharma, *Polymer*, **41**, 5749 (2000).
4. G. Hillmanna, A. Steinkamp-Zuchta, W. Geurtsena, G. Grossb and A. Ho.mannb, *Biomaterials*, **23**, 1461 (2003).
5. M. Canetti, M. Urso and P. Sadocco, *Polymer*, **40**, 2587 (1999).
6. P. Aebischer, R. F. Valentini, P. Dario, C. Domenici and P. M. Galletti, *Brain Research*, **436**, 165 (1987).
7. V. Guenard, R. F. Valentini and P. Aebischer, *Biomaterials*, **13**, 183 (1991).
8. F. Langone, S. Lora, F. M. Veronese, P. Caliceti, P. P. Parnigotto, F. Valenti and G. Palma, *Biomaterials*, **16**, 347 (1995).
9. P. Menei, V. Daniel, C. Montero-Menei, M. Brouillard and J. P. Benoit, *Biomaterials*, **14**, 470 (1993).
10. M. S. Shoichet, S. R. Winn, S. Athavale, J. M. Harris and F. T. Gentile, *Biotechnology and Bioengineering*, **43**, 563 (1994).
11. J. A. Neff, P. A. Tresco and K. D. Caldwell, *Biomaterials*, **20**, 2377 (1999).
12. D. Beyer, M. Matsuzawa, A. Nakao and W. Knoll, *Langmuir*, **14**, 3030 (1998).
13. Y. Iwasaki, S. I. Sawada, N. Nakabayashi, G. Khang, H. B. Lee and K. Ishihara, *Biomaterials*, **20**, 2185 (1999).
14. D. Kleinfeld, K. H. Kahler and P. E. Hockberger, *Journal of Neuroscience Methods*, **8**, 4098 (1988).
15. R. Tarsi, R. A. A. Muzzarelli, C. A. Guzman and C. Pruzzp, *Journal of Dental Research*, **76**, 665 (1997).
16. S. D. Lee, G. H. Hsiue, C. P. Chuen-Thuen and C. Y. Kao, *Biomaterials*, **17**, 16 (1996).
17. K. Fujimoto, H. Tadokoro, Y. Ueda and Y. Ikada, *Biomaterials*, **46**, 442 (1993).
18. J. Chen, Y. C. Nho, and J. S. Park, *Radiat Phys Chem.*, **52**, 201 (1998).

19. I. K. Kang, O. H. Kwon, M. K. Kim, Y. M. LEE and Y. K. Asung, *Biomaterials*, **17**, 841 (1996).
20. I. K. Kang, O. H. Kwon, M. K. Kim, Y. M. LEE and Y. K. Sung, *Biomaterials*, **18**, 1099 (1997).
21. S. Sano, K. Kato, H. B. Lee and J. H. Lee, *Biomaterials*, **14**, 797 (1993).
22. K. L. Carraway, and D. E. Koshloand, *Methods in Enzymol.*, **25**, 616 (1972).
23. D. R. Lloyd, and C. M. Burns, *J. Polym. Sci. Chem Ed.*, **17**, 3459 (1979).
24. P. Aebischer, R. F. Valentini, P. Dario, C. Domenici and P. M. Galletti, *Brain Research*, **436**, 165 (1987).